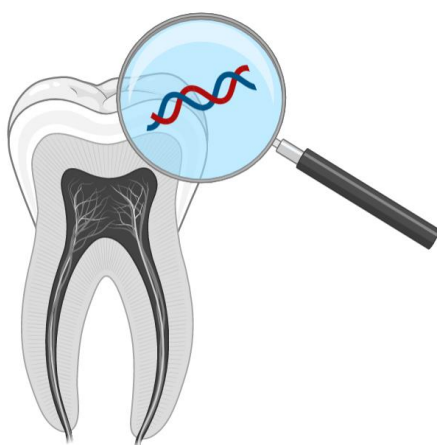


Vědecká příprava pro Zubní lékařství – cvičení

Mgr. Tereza Deissová

doc. RNDr. Petra Bořilová Linhartová, Ph.D., MBA



Vědecká příprava pro Zubní lékařství – cvičení

Mateřské obory: Zubní lékařství (program LF, M-ZL)

Cíle: Studenti získají praktické zkušenosti s molekulárně biologickými analýzami, které jsou rutinně využívány ve stomatologickém výzkumu i při diagnostice pacientů s onemocněním (nejenom) ústní dutiny.

Náplň cvičení: Studenti se seznámí s odběrem vzorku ze sliznice dutiny ústní, s následným postupem izolace DNA a s metodikou real-time PCR. Studenti budou mít možnost si stanovit dva jednonukleotidové polymorfizmy v genu pro methylenetetrahydrofolát reduktázu (MTHFR), což je enzym sehrávající důležitou roli v metabolické přeměně kyseliny listové. Studenti se v rámci cvičení naučí predikovat fenotyp (schopnost metabolizovat kyselinu listovou) po sestavení haplogenotypu MTHFR. Pokud budou analýzu dělat na svých vlastních vzorcích bukalních stěrů, tak jim tato informace může být prospěšná v prevenci některých onemocnění. Studentům, kteří nebudou chtít analyzovat své vlastní vzorky, bude poskytnuta možnost izolovat anonymní vzorky, které jsou určeny na výzkum.

Autorky:

Mgr. Tereza Deissová^{1,2}

doc. RNDr. Petra Bořilová Linhartová, Ph.D., MBA^{1,2,3,4}

¹ Stomatologická klinika, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita Brno

² Ústav patologické fyziologie, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita Brno

³ Ústav lékařské genetiky, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita Brno

⁴ Klinika ústní, čelistní a obličejové chirurgie, Fakultní nemocnice Brno

Recenzovali:

RNDr. Mária Hovořáková, Ph.D.

Ústav histologie a embryologie. 1. Lékařská fakulta, Univerzita Karlova Praha

doc. MUDr. Jakub Suchánek, Ph.D.

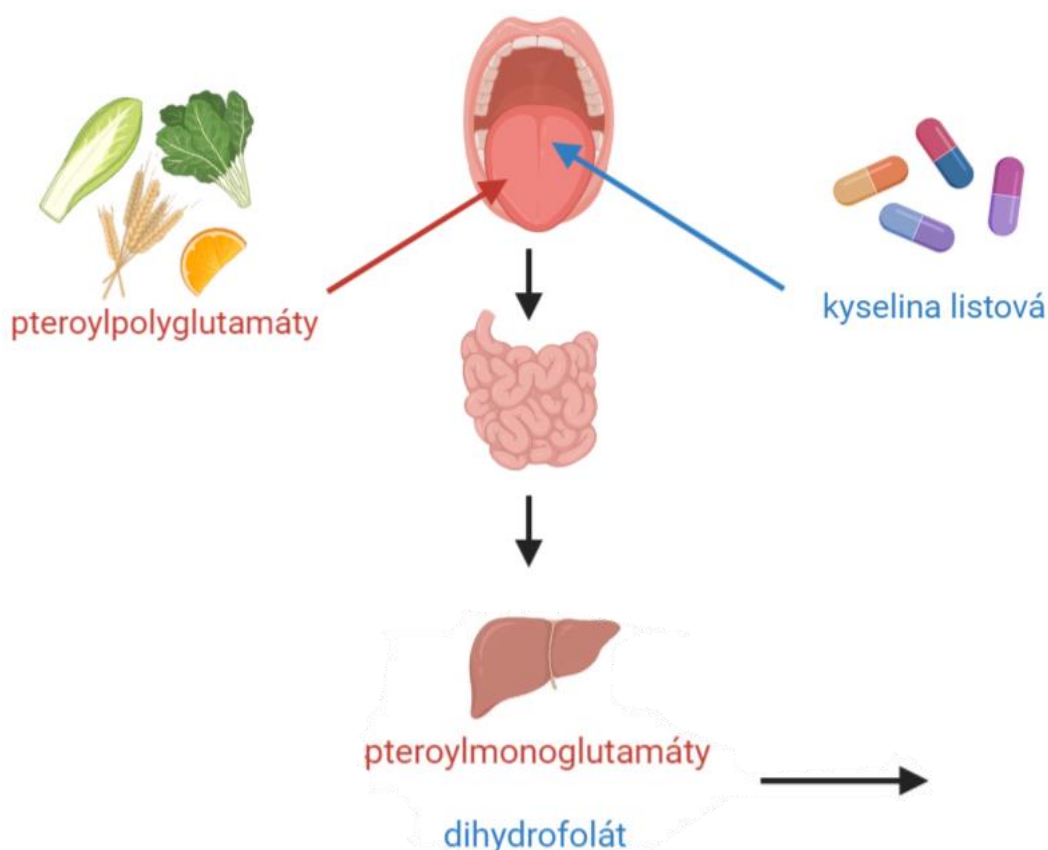
Stomatologická klinika, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova

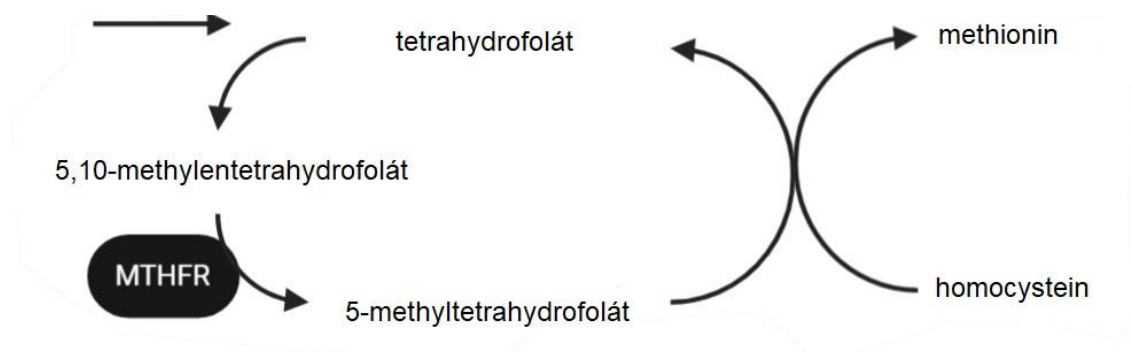
Poděkování: Podpořeno z projektu MUNI/FR/1406/2019 Vědecká příprava pro Zubní lékařství. Autorky děkují za revizi textu prof. MUDr. Lydii Izakovičové Hollé, Ph.D. (Stomatologická klinika, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita Brno).

1. Teoretický úvod

Foláty a methylenetetrahydrofolát reduktáza

Folát je obecný termín používaný k označení různých chemických forem ve vodě rozpustného vitamínu B9 a jeho derivátů. V některých potravinách, jako jsou například citrusy, luštěniny, játra, kvasnice a listová zelenina, se přirozeně vyskytují foláty ve formě tzv. pteroylpolyglutamátů. Ty jsou ve střevech hydrolyzovány na pteroylmonoglutamáty, které přecházejí do krevního řečiště a jsou konvertovány na tetrahydrofolát. Potravinové doplňky a potraviny uměle obohacené o foláty obsahují nejčastěji kyselinu pteroyl-monoglutamovou, známou pod označením kyselina listová. Ta musí být nejprve pomocí jaterního enzymu dihydrofolát reduktázy metabolizována na dihydrofolát a až následně na tetrahydrofolát. Metylací tetrahydrofolátu pak vzniká 5,10-methylenetetrahydrofolát, který je zapojen do methioninového cyklu.^{1,2} Redukcí této sloučeniny pomocí klíčového enzymu methylenetetrahydrofolát reduktázy (MTHFR) vzniká aktivní forma folátu, 5-methyltetrahydrofolát, který slouží v následné reakci jako donor methylové skupiny, která je využita pro remethylaci homocysteinu a vznik esenciální aminokyseliny methioninu,³ viz obrázek 1.





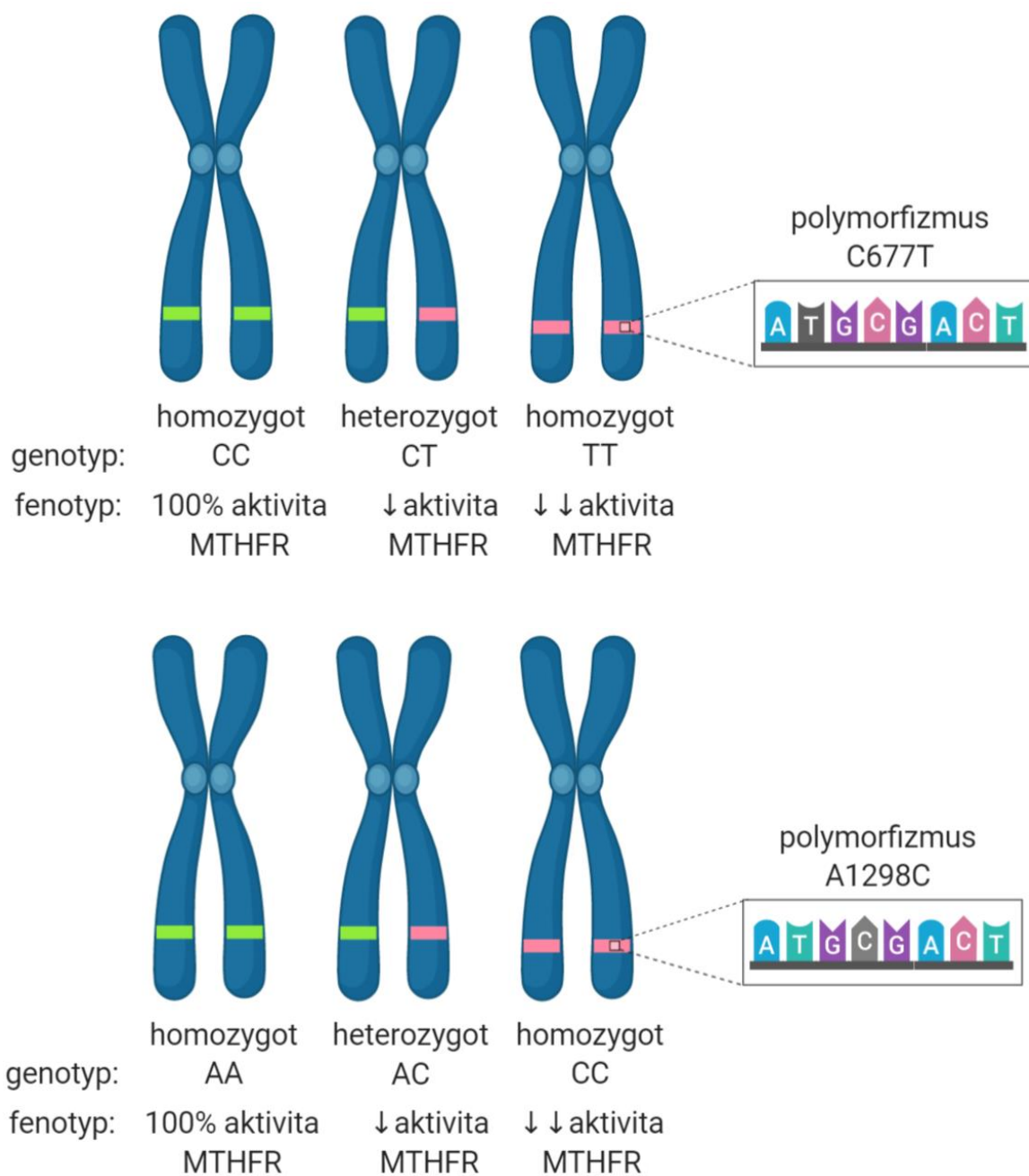
Obrázek 1: Zjednodušené schéma metabolizace přírodních a syntetických folátů (vytvořeno pomocí programu BioRender.com)

Foláty nejsme schopni sami syntetizovat a jsme tedy závislí na jejich příjmu z potravy. Pro dospělé osoby se doporučuje 400 µg ekvivalentu folátu denně, pro těhotné ženy až 600 µg. Typická strava většiny evropských zemí je však, co se týče obsahu folátů, deficitní. Navíc jejich vstřebatelnost ovlivňuje mnoho faktorů, především záleží na formě folátu (syntetické foláty se vstřebávají lépe než přírodní), dlouhodobém užívání některých léků a konzumaci alkoholu. Kromě toho jsou foláty termolabilní a citlivé na světlo. Situaci komplikuje také fakt, že někteří jedinci mají problém s jejich metabolizací.^{4,5}

Variabilita v genu pro methylenetetrahydrofolát reduktázu

Existují dva jednonukleotidové polymorfizmy C677T a A1298C nacházející se v genu kódujícího enzym MTHFR, které snižují enzymatickou aktivitu MTHFR a negativně působí na přeměnu homocysteinu.⁶ Jednonukleotidovým polymorfismem (SNP z anglického single-nucleotide polymorphism) rozumíme substituci jednoho nukleotidu v molekule DNA. V těchto dvou konkrétních případech se jedná o záměnu cytosinu (původní alela) za tymin (mutantní alela) na 677 pozici genu *MTHFR* (C677T) a záměnu adeninu (původní alela) za cytosin (mutantní alela) na 1298 pozici genu *MTHFR* (A1298C). Mutantní alela může vzniknout buď „de novo“ nebo ji můžeme zdědit od svých rodičů. Protože se oba SNPs nacházejí v tzv. kódující oblasti DNA, mohou mít mutace vliv na výsledný genový produkt, tedy na samotný enzym MTHFR.

Každý gen je v diploidní buňce vyjádřen dvěma alelami, které dohromady tvoří genotyp. Nositelům stejných alel říkáme homozygoti, nositelé různých alel jsou označováni jako heterozygoti. U homozygotů CC (v případě polymorfizmu C677T) a AA (v případě polymorfizmu A1298C) zůstává enzymová aktivita MTHFR nezměněna. V případě heterozygotů, tedy jedinců, kteří mají jednu alelu mutantní, je enzymová aktivita MTHFR snížena. Homozygoti s oběma mutantními alelami, tedy s genotypem TT (v případě polymorfizmu C677T) nebo genotypem CC (v případě polymorfizmu A1298C) mívají aktivitu tohoto enzymu redukovanou až o 70 %, viz obrázek 2. Navíc mají oba polymorfizmy na výsledný fenotyp aditivní efekt. To znamená, že jedinec s kombinací genotypů TT (C677T) a CC (A1298C), tedy haplogenotypem TTCC, má aktivitu enzymu MTHFR nejnižší, viz tabulka 1.



Obrázek 2: Polymorfizmy v genu pro methylenetetrahydrofolát reduktázu (*MTHFR* C677T; A1298C) a jejich vliv na aktivitu enzymu MTHFR (vytvořeno pomocí programu BioRender.com)

Tabulka 1: Jednotlivé haplogenotypy vzniklé kombinací genotypů obou SNPs

SNP	A1298T genotyp AA	A1298T genotyp AC	A1298T genotyp CC
C677T genotyp CC	CCAA 100% aktivita MTHFR	CCAC 80%	CCCC 60%
C677T genotyp CT	CTAA 65%	CTAC 50%	CTCC 30%
C677T genotyp TT	TTAA <30%	TTAC <30%	TTCC <10% aktivita MTHFR

Onemocnění asociovaná s nedostatkem vitamínu B9 a enzymopatií MTHFR

Nedostatečná saturace obyvatelstva foláty v kombinaci se sníženou aktivitou MTHFR enzymu se manifestuje na úrovni rychle se dělících buněk (lymfocyty, erytrocyty) nejčastěji jako megaloblastická anémie, ale také jako hyperhomocysteinémie a porucha syntézy DNA. Všechny tyto symptomy jsou rizikovými faktory kardio- a cerebrovaskulárních chorob a defektů neurální trubice během prenatálního vývoje.^{5,7}

Vrozené vývojové vady a hormonální antikoncepce

Při nedostatku kyseliny listové v těhotenství hrozí riziko vrozených vývojových vad (mj. rozštěpových vad), potratu či předčasného odloučení placenty. Nedostatek kyseliny listové může také snižovat plodnost, a proto je vhodné před plánovaným početím tento vitamín doplňovat. Především ženy s jednostrannou stravou, kuřačky a ženy užívající orální hormonální antikoncepci mají výrazně snížené hladiny kyseliny listové. Přitom po vysazení hormonální antikoncepce se bez suplementace folátů jejich původní koncentrace obnoví až za zhruba tři měsíce.^{8,9}

Kardiovaskulární choroby

Zvýšená koncentrace homocysteinu v krvi je také spojována s oxidačním stresem, poškozením endotelu, zvýšením trombogenicity a rizikem rozvoje aterosklerózy. Nedávná meta-analýza potvrdila, že užívání kyseliny listové vede k redukci koncentrace homocysteinu a výraznému snížení rizika cévní mozkové příhody¹⁰ a ischemické choroby srdeční.¹¹

Recidivující aftózní stomatitida

Recidivující aftózní stomatitida označovaná také jako RAS (z anglického recurrent aphthous stomatitis) je chronické onemocnění sliznic dutiny ústní projevující se tvorbou bolestivých erozí až ulcerací. Jedná se multifaktoriální onemocnění, v jehož etiopatogenezi mohou hrát roli lokální trauma, potravinové alergie, mikrobiální dysbióza, infekční agens, stres, hormonální změny, imunologický profil pacienta, genetická predispozice i nutriční faktory (deficit kyseliny listové, železa a vitamínu B12). Léčba RAS je zatím pouze symptomatická a odpověď na ni není u některých pacientů dostatečná.¹²

Dle porovnání údajů z tzv. „diet history“ dotazníků bylo zjištěno, že pacienti s RAS mají v porovnání se zdravou populací významně nižší denní příjmy vitamínu B12 a folátu.¹³ Navíc mají tito pacienti v krvi signifikantně vyšší koncentraci homocysteinu a nižší koncentraci

hemoglobinu, železa, vitamínu B12 a kyseliny listové.¹⁴ Nižší koncentrace vitamínu B12, folátu a ferritinu byla u pacientů s RAS nalezena také ve slinách.¹⁵ Kalkan *et al.* (2014) spojili mutantní alelu T a genotyp TT polymorfismu C677T s větším počtem orálních ulcerací u pacientů s tímto onemocněním.¹⁶ Jedincům trpícím RAS, kteří mají sníženou schopnost metabolizovat foláty, může být v rámci personalizované profylaxe indikována modifikovaná Škachova vitamínová kúra (aktivní folát, vitamín B6 a vitamín D3).¹⁷

Gingivitida a zubní kaz

Gingivitida (zánět gingivy) je poměrně běžně se vyskytující onemocnění. Při jeho včasné diagnóze a léčbě lze předcházet dalšímu poškození tkáně a vzniku parodontitidy. Hlavním rizikovým faktorem pro rozvoj tohoto onemocnění je špatná ústní hygiena dovolující akumulaci zbytků stravy a vznik biofilmu. Bakterie pak napadají slizniční buňky a poškozují je, což spouští imunitní odpověď a další rozvoj zánětu. Dalšími rizikovými faktory jsou: kouření a hormonální změny.¹⁸ Používáním ústní vody obsahující 5 mg/5 ml folátu 2 krát denně po dobu 4 týdnů došlo u jedinců s gingivitidou ke snížení počtu míst se změnou barvy sliznice a krvácením v důsledku gingivitidy v porovnání se skupinou pacientů se zánětem dásní, kteří užívali placebo.¹⁹ Protektivní efekt na výskyt krvácení gingivy má i příjem kyseliny listové, což může představovat nový klinický cíl pro léčebnou intervenci na podporu zdraví dásní.²⁰

Zubní kaz je v populaci velmi rozšířené onemocnění poškozující tvrdé zubní tkáň. Vzniká působením bakterií pokrývajících povrch zubu, které metabolizují fermentovatelné sacharidy z potravy na organické kyseliny. Ty pak demineralizují sklovinu a snižují její tvrdost. K rozvoji této choroby přispívají faktory environmentální i genetické.²¹ Vysoké množství homocysteinu jako oxidativního markeru ve slinách v důsledku sníženého příjmu folátů, ovlivňuje kariézní aktivitu.^{22,23} Navíc se zdá, že původní (wild type) alely polymorfismů C677T a A1298C v genu *MTHFR*, které neovlivňují metabolizaci folátů, jsou protektivními faktory proti rozvoji obou těchto orálních onemocnění - gingivitidy i zubního kazu u dětí české populace.²⁴

Deficit folátů lze řešit prostřednictvím potravinových doplňků nebo potravin uměle obohacených o folát. Pro jedince s metabolickými defekty způsobenými polymorfismy v *MTHFR* je však vhodné suplementovat foláty přímo v podobě 5-methyltetrahydrofolátu (aktivního folátu) a zabránit tak hromadění nepřeměněné kyseliny listové v periferním oběhu a jejím potenciálně negativním účinkům.²⁵

Použité zdroje

- (1) Suitor, C. W.; Bailey, L. B. Dietary Folate Equivalents: Interpretation and Application. *J. Am. Diet. Assoc.* **2000**, *100* (1), 88–94. [https://doi.org/10.1016/S0002-8223\(00\)00027-4](https://doi.org/10.1016/S0002-8223(00)00027-4).
- (2) Lucock, M. Folic Acid: Nutritional Biochemistry, Molecular Biology, and Role in Disease Processes. *Mol. Genet. Metab.* **2000**, *71* (1), 121–138. <https://doi.org/10.1006/mgme.2000.3027>.
- (3) Föding, M.; Hörl, W. H.; Sunder-Plassmann, G. Molecular Biology of 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase. *J. Nephrol.* **2000**, *13* (1), 20–33.
- (4) McNulty, H.; Pentieva, K. Folate Bioavailability. *Proc. Nutr. Soc.* **2004**, *63* (4), 529–536. <https://doi.org/10.1079/PNS2004383>.
- (5) Stránský, M. Preventivní účinky kyseliny listové. *Interní Medicina* **2011**, *13* (4), 159–162.
- (6) Weisberg, I.; Tran, P.; Christensen, B.; Sibani, S.; Rozen, R. A Second Genetic Polymorphism in Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Associated with Decreased Enzyme Activity. *Mol. Genet. Metab.* **1998**, *64* (3), 169–172. <https://doi.org/10.1006/mgme.1998.2714>.
- (7) CGB laboratoř a.s. Molekulárně genetické vyšetření vybraných sekvenčních variant genů asociovaných s rozvojem kardiovaskulárních onemocnění <http://www.pathology.cz/molekularne->

geneticke-vysetreni-vybranych-sekvencnich-variant-genu-asociovaných-s-rozvojem-kardiovas--2455.html (accessed Oct 6, 2020).

- (8) Doležálková, E.; Unzeitig, V. Kyselina listová a prevence rozštěpových vad centrálního nervového systému. *Čes Gynek* **2014** (2), 134–139.
- (9) Shere, M.; Bapat, P.; Nickel, C.; Kapur, B.; Koren, G. Association Between Use of Oral Contraceptives and Folate Status: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Obstet. Gynaecol. Can.* **2015**, *37* (5), 430–438. [https://doi.org/10.1016/S1701-2163\(15\)30258-9](https://doi.org/10.1016/S1701-2163(15)30258-9).
- (10) Wang, Y.; Jin, Y.; Wang, Y.; Li, L.; Liao, Y.; Zhang, Y.; Yu, D. The Effect of Folic Acid in Patients with Cardiovascular Disease. *Medicine (Baltimore)* **2019**, *98* (37). <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000017095>.
- (11) Homocysteine Studies Collaboration. Homocysteine and Risk of Ischemic Heart Disease and Stroke: A Meta-Analysis. *JAMA* **2002**, *288* (16), 2015–2022. <https://doi.org/10.1001/jama.288.16.2015>.
- (12) Borilova Linhartova, P.; Valová; Izakovicova Holla, L. Vrozená Náchylnost k Recidivující Aftózní Stomatitidě (Přehledový Článek) Genetic Predisposition to Recurrent Aphthous Stomatitis (Review). *Ceskoslovenská Stomatol.* **2017**, *117*, 27–34.
- (13) Kozlak, S. T.; Walsh, S. J.; Lalla, R. V. Reduced Dietary Intake of Vitamin B12 and Folate in Patients with Recurrent Aphthous Stomatitis. *J. Oral Pathol. Med.* **2010**, *39* (5), 420–423. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2009.00867.x>.
- (14) Sun, A.; Chen, H.-M.; Cheng, S.-J.; Wang, Y.-P.; Chang, J. Y.-F.; Wu, Y.-C.; Chiang, C.-P. Significant Association of Deficiencies of Hemoglobin, Iron, Vitamin B12, and Folic Acid and High Homocysteine Level with Recurrent Aphthous Stomatitis. *J. Oral Pathol. Med.* **2015**, *44* (4), 300–305. <https://doi.org/10.1111/jop.12241>.
- (15) Pourzare mehrbani, S.; Motahari, P.; Zaheri, F. Evaluation of Salivary Folate, Ferritin, and Vitamin B12 in Patients with Recurrent Aphthous Ulcers. *J. Mashhad Dent. Sch.* **2020**, *44* (3), 209–215.
- (16) Kalkan, G.; Karakus, N.; Yigit, S. Association of MTHFR Gene C677T Mutation with Recurrent Aphthous Stomatitis and Number of Oral Ulcers. *Clin. Oral Investig.* **2014**, *18* (2), 437–441. <https://doi.org/10.1007/s00784-013-0997-0>.
- (17) Bořilová Linhartová, P.; Fassmann, A.; Linhartová, J.; Izakovičová Hollá, L. Farmakoterapie Recidivující Aftózní Stomatitidy u Pacientů s Geneticky Podmíněnou Sníženou Schopností Metabolizovat Kyselinu Listovou - Pilotní Studie. *Pharmacother. Recurr. Aphthous Stomatitis Patients Genet. Impair. Abil. Metab. Folic Acid - Pilot Study* **2019**, *119* (1), 4–11.
- (18) Cope, G.; Cope, A. Gingivitis: Symptoms, Causes and Treatment. *Dent. Nurs.* **2011**, *7* (8), 436–439. <https://doi.org/10.12968/denn.2011.7.8.436>.
- (19) Pack, A. R. C. Folate Mouthwash: Effects on Established Gingivitis in Periodontal Patients. *J. Clin. Periodontol.* **1984**, *11* (9), 619–628. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.1984.tb00914.x>.
- (20) Esaki, M.; Morita, M.; Akhter, R.; Akino, K.; Honda, O. Relationship between Folic Acid Intake and Gingival Health in Non-Smoking Adults in Japan. *Oral Dis.* **2010**, *16* (1), 96–101. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2009.01619.x>.
- (21) Opal, S.; Garg, S.; Jain, J.; Walia, I. Genetic Factors Affecting Dental Caries Risk. *Aust. Dent. J.* **2015**, *60* (1), 2–11. <https://doi.org/10.1111/adj.12262>.
- (22) LeBlanc, J. G.; Giori, G. S. D. *B Group Vitamins: Current Uses and Perspectives*; BoD – Books on Demand, 2018.
- (23) Kumar, D.; Pandey, R. K.; Agrawal, D.; Agrawal, D. An Estimation and Evaluation of Total Antioxidant Capacity of Saliva in Children with Severe Early Childhood Caries. *Int. J. Paediatr. Dent.* **2011**, *21* (6), 459–464. <https://doi.org/10.1111/j.1365-263X.2011.01154.x>.
- (24) Bořilová Linhartová, P.; Mrázková, J.; Novák, D.; Kukletová, M.; Kukla, L.; Izakovičová Hollá, L. Association of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene variants with dental caries and gingivitis in Czech children. **2018**.
- (25) Scaglione, F.; Panzavolta, G. Folate, Folic Acid and 5-Methyltetrahydrofolate Are Not the Same Thing. *Xenobiotica* **2014**, *44* (5), 480–488. <https://doi.org/10.3109/00498254.2013.845705>.

2. Praktická část

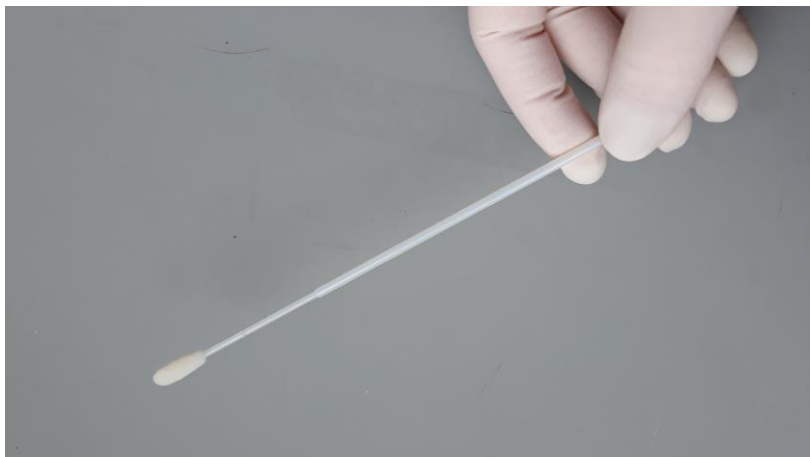
V praktické části cvičení studenti provedou pacientovi (studentovi) stěr z bukální sliznice dutiny ústní. Jedná se o jednoduchou, neinvazivní metodu odběru epitelálních buněk bukální sliznice, ze kterých lze izolovat DNA v dostatečném množství a kvalitě pro následné molekulárně-biologické analýzy. Studenti budou mít možnost sami si vyzkoušet izolaci DNA, zjistit její kvalitu a kvantitu, připravit qPCR, vyhodnotit a interpretovat výsledky.

2.1. Odběr biologického materiálu

Pacient by před odběrem neměl 1 hodinu jíst, pít (kromě vody) a provádět ústní hygienu. Stěr epitelálních buněk z bukální sliznice se provádí odběrovým kartáčkem.

Návod:

- nasadíte si ochranné rukavice
- vyjměte kartáček z obalu, aniž byste se s ním čehokoliv dotkli, manipulujte s kartáčkem pouze za konec tyčinky, viz obrázek 3



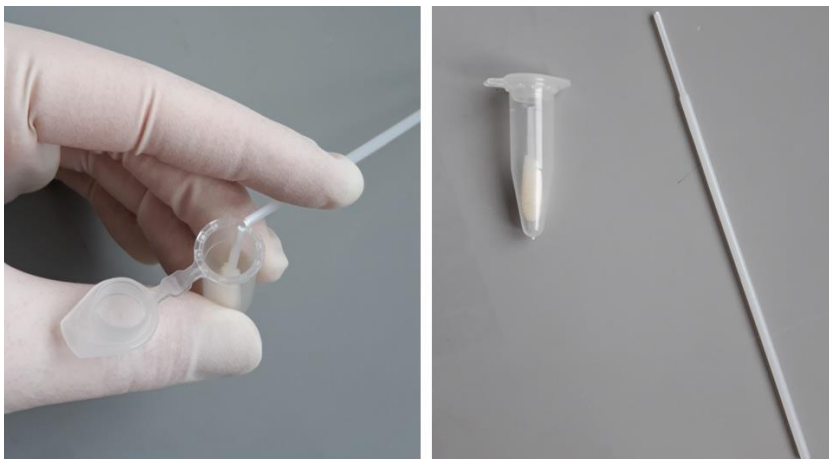
Obrázek 3: Manipulace s odběrovým kartáčkem

- třete a rotujete kartáčkem po sliznici obou tváří asi 1-2 minuty, viz obrázek 4



Obrázek 4: Odběr buněk z bukální sliznice

- vložte kartáček do zkumavky s lyzačním roztokem a proteinázou K a ve zlomovém bodě odlomte tyčinku



Obrázek 5: Odlomení kartáčku do lyzačního roztoku s proteinázou K

2.2. Izolace DNA

Existují různé techniky extrakce DNA, izolace DNA pomocí komerčně dostupných silikátových kolonek je jednou z nich. Nejprve je nutné rozrušit plazmatické a jaderné membrány epiteliálních buněk, aby došlo k uvolnění DNA. K tomu slouží lyzační roztok, jehož hlavní složkou je detergent a chaotropní činidlo. Celému procesu pomáhá enzym proteináza K, která kromě bílkovin také degraduje RNázy a DNázy (enzymy štěpící nukleové kyseliny). Po lýze buněk se uvolněná DNA sráží 96% biologicky čistým etanolem a následně je přenesena na silikátovou kolonku. Vazba DNA na silikátovou kolonku je ve vysoké koncentraci chaotropních solí zprostředkována prostřednictvím vodíkových vazeb. Při centrifugaci je za těchto podmínek DNA zachycena na kolonce, ostatní složky kolonkou protečou. Eluce DNA z kolony probíhá přidáním vody nebo pufru s nízkým obsahem solí a opětovnou centrifugací.

Návod:

- zkumavku se 400 μ l lyzačního roztoku T1 a 25 μ l proteinázy K **vortexujeme 2 x 5 sekund**, viz obrázek 6



Obrázek 6: Izolační kit (vlevo) a vortex (vpravo)

- zkumavku **krátce stočte** na centrifuze, umístěte do termostatu a inkubujte **10 minut při teplotě 56 °C a 600 rpm**, viz obrázek 7



Obrázek 7: Centrifuga (vlevo), termostat (vpravo)

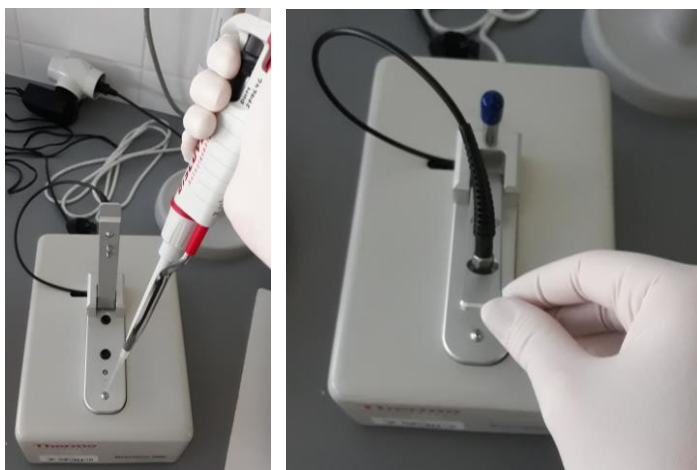
- pomocí sterilní pinzety **odstraňte kartáček** ze zkumavky
- přidejte **400 µl** roztoku **B3** a inkubujte **5 minut při 70 °C**
- vyjměte zkumavku z termostatu a nechte ji **vytemperovat na laboratorní teplotu**
- přidejte **400 µl 96%** biologicky čistého **etanolu**
- **vortexujte 2 x 5 sekund** a krátce **stočte** na centrifuze
- přeneste **600 µl** roztoku **na kolonku** a centrifugujte **1 minutu při 11 000 x g (rcf)**
- **odstraňte supernatant a vraťte kolonku zpět do zkumavky**
- přeneste **dalších 600 µl** roztoku na kolonku a **opakujte postup**
- přeneste **zbylé množství** roztoku na kolonku a centrifugujte **1 minutu při 11 000 x g (rcf)**
- **přeneste kolonku do nové zkumavky**
- přidejte **50 µl** roztoku **B5** a centrifugujte **1 minutu při 11 000 x g (rcf)**
- znovu přidejte **50 µl** roztoku **B5** a centrifugujte **2 minuty při 11 000 x g (rcf)**
- přeneste kolonku do nové 1, 5 ml zkumavky s víčkem
- přidejte **20 µl** roztoku **BE** přímo doprostřed kolonky a centrifugujte **1 minutu při 11 000 x g (rcf)**
- odstraňte kolonku a zkumavku nechte s otevřeným víčkem **30 minut při pokojové teplotě** pro vyprchání zbylého etanolu

2.3. Stanovení kvality a kvantity izolované DNA

Množství a kvalita izolované DNA se nejčastěji stanovuje spektrofotometricky. Nukleové kyseliny mají maximum absorpce světla při 260 nm. NanoDrop umožňuje také stanovit čistotu nukleových kyselin jako poměr absorpance 260/280 nm a 260/230 nm. Pro další molekulárně biologické analýzy by se měla koncentrace izolované DNA pohybovat okolo 50 ng/μl. Poměr absorpance 260/280 by měl být $\geq 1,8$. Pokud je tento poměr menší než 1,8 ukazuje to na kontaminaci bílkovinami, protože tryptofan a další aminokyseliny mají maximum absorpce světla při 280 nm. Poměr absorpance 230/260 by se měl pohybovat okolo 2. Nižší hodnota ukazuje na kontaminaci organickými činidly používanými při extrakci (guanidin apod.). Kontaminovaná DNA lze purifikovat přesrážením etanolem nebo pomocí magnetických kuliček, vždy ale za cenu ztráty určitého množství DNA.

Návod:

- do místa průchodu paprsku naneste **2 μl elučního roztoku (BE)**, viz obrázek 8



Obrázek 8: Nanesení vzorku na NanoDrop

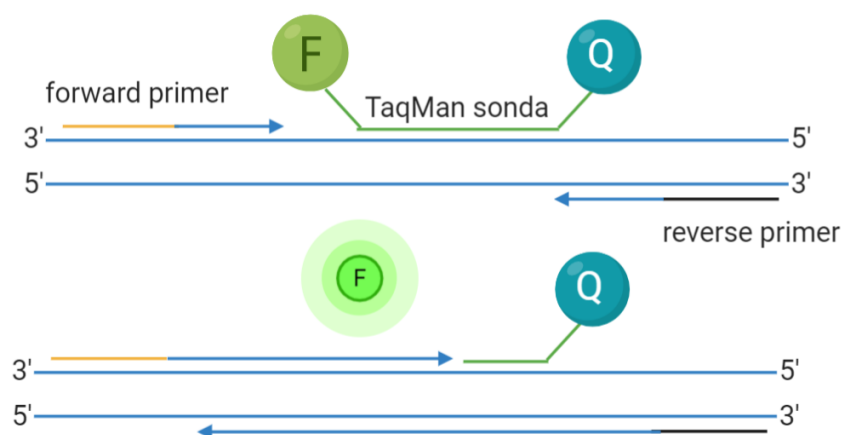
- zmáčkněte tlačítko **BLANK** a vyčkejte, až přístroj nastaví blank
- **setřete** kapičku buničinou
- na stejné místo naneste **2 μl vzorku DNA**
- zmáčkněte tlačítko **MEASURE** a vyčkejte na výsledek
- setřete kapičku buničinou
- zaznamenejte a vyhodnoťte výsledek

2.4. qPCR

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je základní molekulárně biologické metoda umožňující amplifikovat (namnožit) určitý úsek DNA. Tato metoda má mnoho modifikací, v tomto cvičení si vyzkoušíme PCR v reálném čase (qPCR) s využitím fluorescenčně značených TaqMan sond. Začneme přípravou reakčního mixu, ten kromě vody a pufru obsahuje také nukleotidy (adenin, thymin, guanin a cytosin) – stavební kameny pro nové vlákno DNA, DNA polymerázu – enzym začleňující tyto stavební kameny do nově vznikajícího

řetězce a hořčnaté ionty jako katalyzátory celé této reakce. Dále se do reakce přidá TaqMan sonda obsahující primery, které jsou komplementární k určitému úseku na *MTHFR* genu a na kterých DNA polymeráza zahajuje syntézu nového vlákna DNA a samotnou sondu (dva druhy oligonukleotidů, každý s jiným fluoroforem), která je komplementární k místu na *MTHFR* genu, kde se nachází polymorfismus. Například v přítomnosti nukleotidu A v místě polymorfismu nasedá oligonukleotid s fluoroforem VIC a v případě nukleotidu G nasedá oligonukleotid s fluoroforem FAM. Po smíchání reakčního mixu s DNA získáme reakční směs, kterou umístíme do PCR cycleru.

Samotná PCR reakce se skládá z několika fází. První fáze je denaturace, kdy se vlákna dvouřetězcové DNA rozmotají, a výsledkem je jednořetězcová DNA. Probíhá obvykle při teplotě 95 °C. Následně se teplota sníží na teplotu annealingu, tedy nasedání primerů na komplementární úseky DNA. Teplota se v tomto kroku může lišit, ale u TaqMan sond je zpravidla 60 °C. Současně v tomto kroku DNA polymeráza nasedá na primer a začíná syntetizovat nový řetězec DNA. Schopnost DNA polymerázy ale není pouze syntéza nového řetězce, ale také odstraňování nukleotidů, které jí při syntéze nového vlákna stojí v cestě (exonukleázová aktivita). Proto, když DNA polymeráza narazí na oligonukleotid s fluoroforem, odstraní ho. Fluorofor je na oligonukleotid vázaný spolu se žhářčem fluorescence, v tomto stavu tedy nejsme schopni zaznamenat jeho záření. V okamžiku, kdy DNA polymeráza odstraňuje jednotlivé nukleotidy tvořící oligonukleotid, se fluorofor uvolní od žhářče a přístroj zaznamená fluorescence, viz obrázek 9. My tak můžeme sledovat nárůst fluorescence, který je úměrný množství vznikajícího amplifikačního produktu v reálném čase.



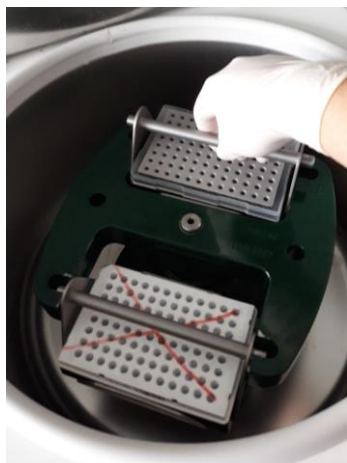
Obrázek 9: Princip PCR při použití TaqMan sond (vytvořeno pomocí programu BioRender.com)

Návod:

- do 1,5 ml zkumavky napipetujte reagenty dle tabulky a **připravte reakční mix**

reagencie	koncentrace zásobního roztoku	koncentrace v reakci	objem
Master Mix	2x	1x	10 µl
Primer-probe Mix	4x	1x	5 µl

- reakční mix **vortexujte 2 x 5 sekund**
- přeneste **15 µl reakčního** mixu do reakční destičky/stripu
- přidejte **5 µl DNA**/negativní kontroly (vody)/pozitivní kontroly
- **zalepte** destičku fólií
- krátce **stočte**, viz obrázek 10

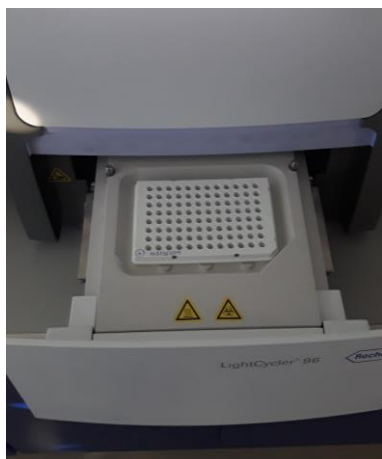


Obrázek 10: Centrifugace PCR destičky

- na LightCycler 96 Roche nastavte program

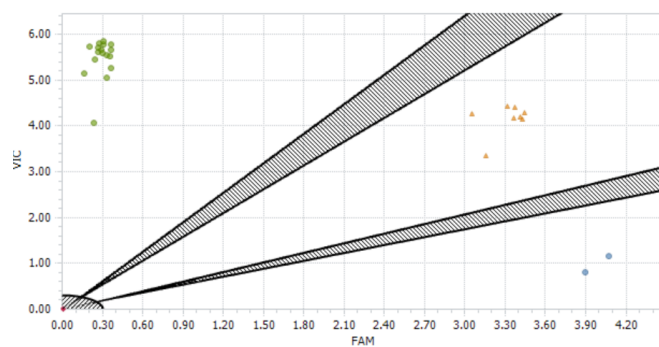
program	teplota	čas	počet cyklů
denaturace	95 °C	600 sekund	1x
dvou-kroková amplifikace	95 °C	10 sekund	40x
	60 °C	30 sekund	

- umístěte do LightCycler 96 Roche a spusťte program, obrázek 11

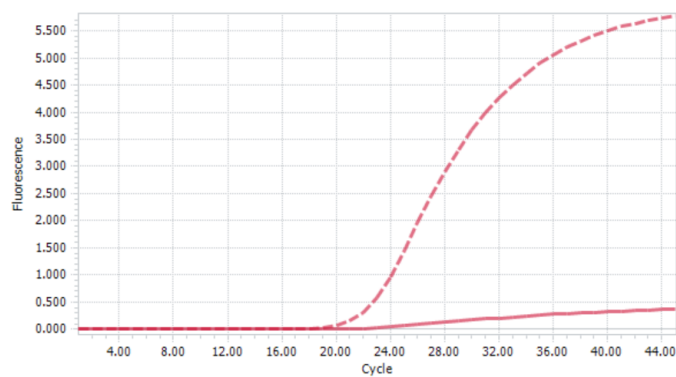


Obrázek 11: Umístění destičky v LightCycleru 96 Roche

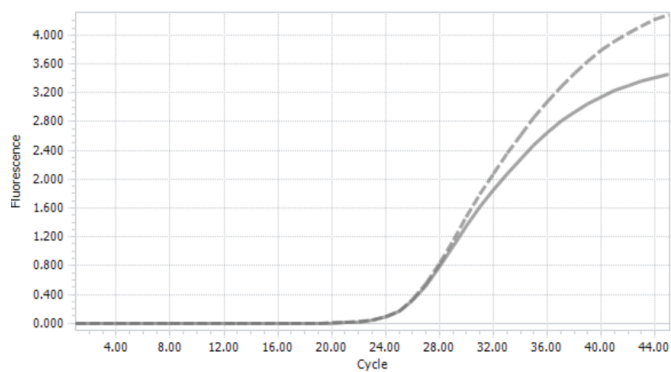
- vyhodnoťte výsledek, viz obrázky 12-15



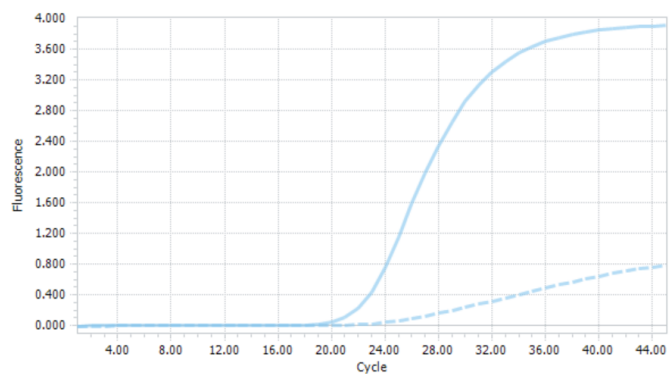
- zelené kolečko = homozygot VIC



- žlutý trojúhelník = heterozygot



- modré kolečko = homozygot FAM



Obrázek 12-15: Grafy znázorňující jednotlivé genotypy

2.5. Vyhodnocení

Vypracujte protokol (viz níže), kde uvedete koncentraci a kvalitu izolované DNA, vyhodnotíte genotyp obou stanovených polymorfizmů v genu *MTHFR* a na základě sestaveného haplogenotypu určíte předpokládaný fenotyp pacienta (schopnost metabolizovat kyselinu listovou). Do protokolu dále uveďte, co byste jako zubní lékaři, doporučili pacientovi s tímto nálezem.

Vyšetření na přítomnost polymorfizmů C677T a A1289C genu <i>MTHFR</i>			
Metoda: TaqMan PCR			
Kód vzorku:			
Vstupní materiál:			
Koncentrace DNA:		Čistota DNA (260/280):	
		Čistota DNA (260/230):	
Genotyp:			
C677T:		A1289C:	
Haplogenotyp (C677T/A1289C):			
Fenotyp:			
Doporučení:			